

DISEÑO *IN SILICO* DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE FAGOS PARA LA ERRADICACIÓN DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM*.

In silico design of phage-derived antimicrobial peptides for the eradication of *Enterococcus faecium*.

 Igor Eduardo Astudillo Skliarova ⁽¹⁾
igor.astudillo@esPOCH.edu.ec

¹ Carreras de Nutrición y Dietética, y Medicina. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, 060101, Ecuador.

Autor de correspondencia:

Correo: igor.astudillo@esPOCH.edu.ec

RESUMEN

Introducción: *Enterococcus faecium* ha generado creciente preocupación debido a su asociación con infecciones nosocomiales y resistencia a antibióticos, siendo responsable de la mayoría de las infecciones por enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) y formando biofilms que confieren resistencia a antibióticos como linezolid y tigeciclina. **Materiales y Métodos:** Se diseñaron péptidos derivados de fagos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5 para *E. faecium*. Se utilizó el servidor AMP Scanner vr.2 para identificar candidatos a péptidos antimicrobianos (PAMs), y luego los servidores CellPPD, dPABB y ToxinPred para evaluar la penetración en células bacterianas, la erradicación de biofilms y la toxicidad, respectivamente. **Resultados:** Se identificaron proteínas con actividad antibacteriana que sirvieron como base para la identificación de PAMs, los cuales mostraron buena penetración celular, capacidad para erradicar biofilms y baja toxicidad. **Discusión:** Los PAMs derivados de los fagos presentan dominios HNH y metaloproteasas dependientes de ATP, además de actividades putativas de factor sigma y NAMLAA asociadas con la lisis bacteriana o la replicación de fagos. **Conclusión:** El diseño *in silico* de péptidos de fagos ofrece una solución prometedora para tratar infecciones por *E. faecium* y otras bacterias, resaltando el potencial de los PAMs para avanzar en la terapia antimicrobiana ante la resistencia a los antibióticos.

Palabras claves: Fagoterapia, péptidos antimicrobianos (PAMs), *Enterococcus faecium*, erradicación de biofilms, resistencia a los antibióticos..

ABSTRACT

Introduction: *Enterococcus faecium* has raised growing concern due to its association with nosocomial infections and antibiotic resistance, being responsible for most vancomycin-resistant enterococci (VRE) infections and forming biofilms that confer resistance to antibiotics such as linezolid and tigecycline. **Materials and Methods:** Peptides derived from phages vB_Efm_LG62 and vB_EfKS5 were designed for *E. faecium*. The AMP Scanner vr.2 server was used to identify candidates for antimicrobial peptides (AMPs), and then the servers CellPPD, dPABB, and ToxinPred were used to evaluate penetration into bacterial cells, eradication of biofilms, and toxicity, respectively. **Results:** Proteins with antibacterial activity were identified as a basis for the identification of AMPs, which showed good cell penetration, ability to eradicate biofilms, and low toxicity. **Discussion:** AMPs derived from phages feature HNH domains and ATP-dependent metalloproteases, as well as putative activities of sigma factor and NAMLAA associated with bacterial lysis or phage replication. **Conclusion:** The *in silico* design of phage peptides offers a promising solution for treating *E. faecium* infections and other bacteria, highlighting the potential of AMPs to advance antimicrobial therapy in the face of antibiotic resistance.

Keywords: Phage therapy, antimicrobial peptides (AMPs), *Enterococcus faecium*, biofilm eradication, antimicrobial resistance.

1. Introducción

Enterococcus faecium es una bacteria Gram-positiva, anaerobia facultativa que presenta forma de coco (esférica) las cuales se agrupan en cadenas cortas y medianas (1). Esta bacteria vive de manera comensal en el tracto gastrointestinal tanto de humanos como de animales, pero también está asociada a diversas infecciones nosocomiales, como infecciones del tracto urinario, bacteriemias, endocarditis y meningitis, especialmente en pacientes inmunocomprometidos (2, 3). *E. faecium* forma parte del grupo de bacterias ESKAPE, el cual es un conjunto de patógenos oportunistas que representan una creciente amenaza para la salud pública debido a su capacidad de evadir los mecanismos de acción de los antibióticos (4). *E. faecium* y otras especies del género *Enterococcus* incluyen una serie de nuevas variantes resistentes a la vancomicina (5), el cual durante mucho tiempo se ha considerado un antibiótico de último recurso (6). *E. faecium*, en particular, es la bacteria responsable de la mayoría de las infecciones causadas por enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) (7). Adicionalmente, muchos aislados de esta bacteria tienen la capacidad de formar biofilms, los cuales muestran resistencia a varios antibióticos, como el linezolid y la tigeciclina (8).

La aparición y diseminación de cepas bacterianas resistentes a antibióticos constituye en la actualidad un grave problema de salud pública. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se prevé que para el año 2050 habrá 10 millones de muertes cada año causadas por bacterias resistentes a antibióticos (9). En los últimos años, se han propuesto diferentes estrategias alternativas para combatir estas bacterias, las cuales incluyen el uso de bacteriófagos (fagos) o combinación de antibióticos (10). Los fagos son virus que infectan específicamente bacterias. Estos se caracterizan por ser más específicos que los antibióticos, debido a que generalmente solo infectan cepas bacterianas específicas (10). Debido a esto, el uso de fagos como agentes terapéuticos presenta un menor riesgo de causar disbiosis (11). A pesar de la serie de ventajas que presenta la fagoterapia, existen muy pocos ensayos clínicos donde se demuestre su eficacia (12).

Los fagos siguen un ciclo de vida que implica varias etapas. En primer lugar, el fago se adhiere a la superficie de una bacteria específica y luego inyecta su material genético en su interior. Una vez dentro, el material genético del fago toma el control de la

maquinaria celular de la bacteria, obligándola a producir múltiples copias de sí mismo. Estas copias se ensamblan dentro de la bacteria y, finalmente, la célula bacteriana se lisa, liberando nuevos fagos, los cuales posteriormente proceden a infectar otras células bacterianas cercanas, repitiendo el ciclo de infección (13). Los fagos atemperados, a diferencia de los virulentos, pueden seguir el ciclo lisogénico, el cual implica la integración de su genoma en el cromosoma bacteriano (14). Este mecanismo permite a estos fagos transferir genes bacterianos (durante la escisión de su DNA), incluidos aquellos de resistencia a antibióticos, en una población bacteriana (15). Debido a esta capacidad de transferencia horizontal de genes, los fagos atemperados no se consideran idóneos para la fagoterapia (16).

Los fagos tienen un conjunto de genes que se expresan en diferentes etapas de su ciclo de vida (14). Los genes tempranos son aquellos que se expresan temprano en la infección y están involucrados principalmente en la regulación de la transcripción y la replicación del DNA del fago, así como en la toma de control de la maquinaria molecular de la bacteria huésped (17). Por otro lado, los genes tardíos se expresan más tarde durante el proceso de infección y están implicados en la síntesis de proteínas estructurales del fago, necesarias para ensamblar nuevas partículas del virus y, en muchos casos, en la lisis de la bacteria (18). Esta división temporal en la expresión génica de los fagos es esencial para coordinar eficientemente la producción de nuevos fagos y completar su ciclo de replicación. Los productos de varios de estos genes pueden resultar tóxicos para la bacteria huésped, lo que los convierte en posibles candidatos que puedan ser considerados agentes antibacterianos (19). Además, estas proteínas podrían servir como punto de partida para el desarrollo de péptidos antimicrobianos (PAMs) (20), los cuales tienen una serie de ventajas con relación a los antibióticos convencionales. Entre estas, se incluye una aparición más lenta de resistencia, una actividad de amplio espectro contra los biofilms y la capacidad de modular de forma positiva la respuesta inmunitaria del huésped (21). Además, gracias a su pequeño tamaño, los PAMs son más simples de diseñar, sintetizar y optimizar (22).

El objetivo del presente estudio consistió en identificar posibles PAMs mediante el análisis in silico de los productos predichos de los marcos abiertos de lectura (ORFs) del genoma de dos fagos virulentos recientemente aislados, vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5, que infectan específicamente a *E.*

faecium. Además, se buscó determinar el potencial de los PAMs identificados para penetrar en la célula bacteriana y combatir los biofilms.

2. Metodología

2.1 Determinación de los ORFs de los fagos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5.

Las secuencias de los fagos vB_Efm_LG62 (OP018674.1) y vB_EfKS5 (OQ297175.1) fueron obtenidas usando la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los ORFs se determinaron mediante el uso del servidor web PHAge Search Tool with Enhanced Sequence Translation (PHASTEST) (23, 24), el cual permite identificar, anotar y visualizar las secuencias de fagos y plásmidos.

2.2 Identificación de PAMs.

Para identificar los PAMs, se analizó cada uno de los productos predichos de los ORFs de los fagos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5 usando el servidor Antimicrobial Peptide (AMP) Scanner vr.2. Este servidor utiliza técnicas de aprendizaje profundo para mejorar el reconocimiento de PAMs, basado en un modelo de red neuronal con capas convolucionales y recurrentes que aprovechan la composición de secuencia primaria para identificar AMPs de manera efectiva (25). Para llevar a cabo la identificación de los AMPs, la secuencia de aminoácidos de la proteína en formato FASTA se ingresó en el servidor. Los péptidos con una probabilidad superior a 0.5, fueron considerados antimicrobianos potenciales.

2.3 Penetración de la célula bacteriana.

La capacidad de los PAMs para penetrar en la célula bacteriana es esencial para su efectividad en la erradicación del patógeno. Esta capacidad fue predicha en el presente estudio usando el servidor Designing of Cell Penetrating Peptides (CellPPD), el cual utiliza modelos de máquinas de vectores de soporte (SVM) para predecir y diseñar péptidos penetrantes en células (CPPs) mediante el análisis de características como la composición de aminoácidos y perfiles binarios de secuencias de péptidos (26). Los posibles AMPs fueron ingresados en el servidor y aquellos con una puntuación SVM superior a 0.00 fueron considerados capaces de penetrar la célula bacteriana.

2.4 Actividad anti-biofilm.

Los biofilms representan un desafío significativo en la lucha contra los patógenos, ya que les proporcionan protección y resistencia a los tratamientos antimicrobianos (27). Para predecir la capacidad del péptido para erradicar biofilms, se utilizó el servidor dPABB. El algoritmo de Diseño de Péptidos Contra Biopelículas Bacterianas (dPABB) se basa en el análisis de la composición de aminoácidos, residuos seleccionados y posición de los residuos. Los PAMs predichos se ingresaron en el servidor y, dependiendo de su composición completa de aminoácidos, características específicas de los residuos y preferencia posicional de los mismos, se observaron los modelos de SVM y entorno para análisis del conocimiento de la Universidad de Waikato (WEKA) desplegados en dPABBs para encontrar potenciales péptidos con la habilidad de erradicar biofilms (28). Los péptidos que obtuvieron una puntuación SVM superior a 0.00 y una puntuación WEKA superior a 0.50 fueron identificados como capaces de erradicar biofilms.

2.5 Predicción de toxicidad.

Diseñar PAMs requiere una cuidadosa consideración de la toxicidad del péptido. En el presente trabajo se utilizó la herramienta ToxinPred. El programa reconoce residuos específicos de ciertos aminoácidos, incluidos Cys, His, Asn y Pro, y su colocación en diferentes posiciones que los hacen tóxicos (20, 29). De igual forma, esta herramienta emplea modelos de SVM para predecir la toxicidad de los péptidos. Los péptidos con una puntuación de SVM inferior a 0.00 fueron identificados como no tóxicos.

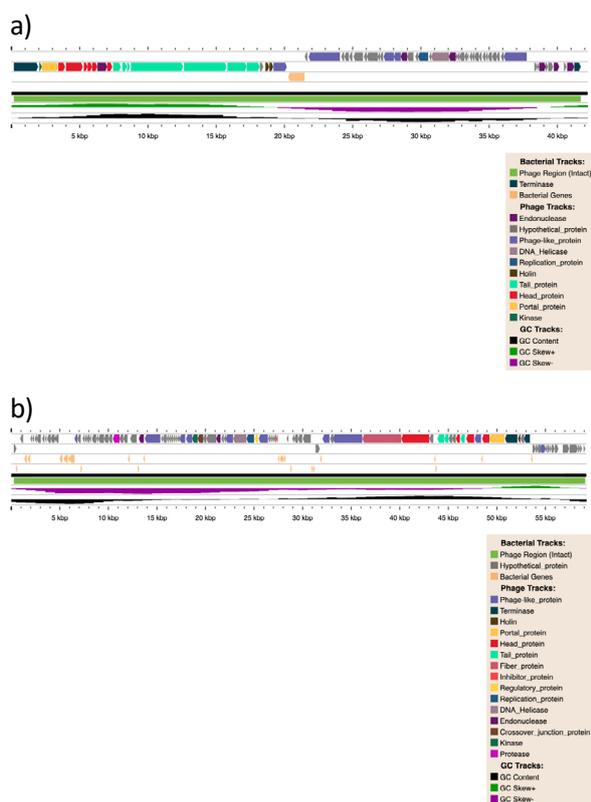
3. Resultados

3.1 ORFs de los fagos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5.

Los fagos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5 poseen genomas de DNA de doble cadena con 42,236 y 59,246 pares de bases (pb), respectivamente (30, 31). El análisis de los genomas de los fagos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5 demostró que codifican 66 y 122 proteínas, respectivamente (Fig. 1). Los fagos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5 presentan respectivamente 12 y 17 proteínas con una función predicha, siendo las proteínas restantes putativas.

3.2 Identificación de proteínas con potencial antibacteriano en los genomas de los fagos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5.

Figura 1: Mapa genómico lineal de los fagos *Enterococcus* vB_Efm_LG62 (a) y *Enterococcus* vB_EfKS5 (b) elaborado con ayuda del servidor PHASTEST (23). Diferentes grupos funcionales de ambos fagos se indican con diferentes colores, según su función.



Utilizando el servidor AMP Scanner Vr. 2, se analizaron exhaustivamente todas las proteínas, incluyendo aquellas con funciones predichas y putativas, con el fin de identificar aquellas con

potencial antimicrobiano. De las 66 proteínas del fago vB_Efm_LG62, se identificaron 9 con actividad antimicrobiana predicha. De manera similar, de las 122 proteínas del fago vB_EfKS5, también se seleccionaron 9 con actividad antimicrobiana predicha. Estas proteínas se detallan en la Tabla 1, donde destacan principalmente aquellas con dominios endonucleasa homing (HNH), factor sigma putativo, N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa (NAMLAA), lisinas y metaloproteasas dependientes de ATP. En este estudio, se priorizaron las proteínas con función putativa, ya que, aunque no se conocen, desempeñan un papel crucial en la replicación y toma de control de la célula bacteriana por parte del fago, lo que las convierte en candidatos potenciales para el diseño de PAMs.

Identificación de PAMs capaces de penetrar las células bacterianas y erradicar biofilms.

Después de identificar las proteínas codificadas por los genomas de los fagos con actividades antimicrobianas, estas sirvieron como punto de partida para la identificación de PAMs, lo cual se llevó a cabo con el servidor dPABB. Se seleccionaron aquellos péptidos (Tabla 2 y 3) que, además de predecirse que tienen la capacidad de penetrar en la célula bacteriana, también se prevé que posean actividad para erradicar biofilms y que no sean tóxicos para el huésped que padece la infección. La actividad antimicrobiana de estos péptidos se confirmó con ayuda del servidor AMP Scanner Vr. 2. Los péptidos identificados se caracterizan por tener mejores niveles de penetración en células y biofilms que las proteínas debido a su menor tamaño (32) y constituyen la parte activa de las proteínas con actividad antimicrobiana.

Tabla 1: Proteínas con actividad antimicrobiana codificadas por el genoma de los fagos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5.

Fago	Posición CDS*	Identificación de proteína	Función putativa o grupo de proteína al que pertenece	Probabilidad de predicción
vB_Efm_LG62	6294..7013	UUW40464.1	Endonucleasa asociada a intrón	0.9939
	19194..20171	UUW40476.1	NAMLAA	0.9967
	24752..24970	UUW40482.1	Proteína hipotética	0.6564
	30594..30755	UUW40493.1	Proteína hipotética	0.9983
	32040..32555	UUW40496.1	Endonucleasa homing	0.9939
	34907..35197	UUW40508.1	Proteína hipotética	0.9005
	38662..39150	UUW40515.1	Endonucleasa homing	0.9899
	39736..40128	UUW40518.1	Endonucleasa homing	0.9851
	40717..41229	UUW40520.1	Endonucleasa homing	0.9989
vB_EfKS5	264..533	WDS60669.1	Proteína hipotética	0.9999
	6819..7154	WDS60690.1	Proteína hipotética	0.7187
	10454..11149	WDS60701.1	Metaloproteasa dependiente de ATP	0.9184
	13136..13648	WDS60707.1	Endonucleasa homing	0.9066
	17996..18628	WDS60720.1	Factor sigma putativo	0.6772
	32053..32766	WDS60753.1	NAMLAA	0.9894
	55025..55162	WDS60781.1	Proteína hipotética	0.9999
	55187..55447	WDS60782.1	Glutaredoxina putativa	0.7043
	55651..55953	WDS60784.1	Proteína hipotética	0.8588

*Coding sequence – Secuencia de codificación

Tabla 2: Péptidos antimicrobianos predichos a partir de las secuencias proteicas del fago vB_Efm_LG62.

Fago	Identificación de proteína	Péptido antimicrobiano	Probabilidad de predicción de ser PAM	Actividad Anti-biofilm (puntuación WEKA)	Toxicidad (puntuación SVM)	Penetración celular (puntuación SVM)
vB_Efm_LG62	UUW40464.1	HHISRCLRGLSRQHKGYTFK	0.7218	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	UUW40476.1	AGIKRPDVKKAYGYQQGQELGFDV-TVNKNQFKGKKVDILRRANK	0.8894	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	UUW40482.1	KGVVLYKLYK	0.7053	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	UUW40493.1	KKYKGYFKKPTGTLDPVKFKKQKQ-VIMSIFITEKPRIGLWVNTYLKYLNK	0.9989	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	UUW40496.1	GRVKRLKGKYSKERILKPCENNTGYLQ-VHLCKNSKSKFYKVRHLVALAF	0.9996	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	UUW40508.1	FSIHLVAKA	0.7417	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	UUW40518.1	VSIPERYCDAHKGHNSQYNKHVRY-NEDNKKYSQFYHSTQWRNARKAKLM	0.8219	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	UUW40520.1	GRVKRLKGKYSKERILKPTKHTTGYLRLVKLCKNNVRFNKKIHLRLVAEAF	0.9975	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)

Tabla 3: Péptidos antimicrobianos predichos a partir de las secuencias proteicas del fago vB_EfKS5.

Fago	Identificación de proteína	Péptido antimicrobiano	Probabilidad de predicción de ser PAM	Actividad anti-biofilm (puntuación WEKA)	Toxicidad (puntuación SVM)	Penetración celular (puntuación SVM)
vB_EfKS5	WDS60669.1	IAKLSACLSRFALRLRPLTPFQYPSKPLT-LRPRK	0.9837	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	WDS60690.1	KKLKSLLTKSIMNGVGHKMSKHFYANT-NPNLA ANYPKGWTSFHHNI	1.0	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	WDS60701.1	IWAALYKAR	0.9349	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	WDS60707.1	GNFIKRFDSPIDAEEKTGVARQNISKV-GRGLRKHA	0.9803	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	WDS60720.1	KILIRLMNRVIMKVK	0.9878	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	WDS60753.1	GSPAAAIHNNMDGVWGVIRPPYEAASTPK PPAPKP	0.6462	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	WDS60781.1	DIWTSLSKFLNQCFCKHDYRTRVQKGLVG IPYQECKKCGR	0.9998	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	WDS60782.1	ISGFHPPKLKAFIKA	0.9874	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)
	WDS60784.1	RVIPFAPKPW	0.9878	Si (> 0.5)	No (< 0.00)	Si (> 0.00)

4. Discusión

En el presente estudio, se realizó un análisis del genoma de los fagos líticos vB_Efm_LG62 y vB_EfKS5, recientemente aislados, que infectan *E. faecium*. Se identificaron ORFs que codifican proteínas con actividad antibacteriana. A partir de estas proteínas, se identificaron PAMs putativos que podrían penetrar la célula bacteriana, erradicar biofilms y que exhiben niveles mínimos o nulos de toxicidad.

La crisis de resistencia a los antibióticos representa un grave problema de salud pública a nivel global. El incremento de bacterias resistentes a los antibióticos ha reducido significativamente

la eficacia de estos fármacos, los cuales son indispensables en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Este fenómeno amenaza con hacer retroceder décadas de progreso en el combate de enfermedades infecciosas e incrementar los costos de atención médica, así como el riesgo de morbilidad asociada a infecciones comunes y procedimientos quirúrgicos (33). La rápida evolución y expansión de la resistencia a los antibióticos destacan la urgencia de desarrollar fármacos o estrategias efectivas para combatir las infecciones provocadas por bacterias resistentes a antibióticos, especialmente, aquellas que pertenecen al grupo ESKAPE (34).

En este estudio, se identificaron PAMs derivados de dominios pertenecientes al grupo de las endonucleasas HNH. Las endonucleasas HNH son enzimas con un motivo HNH conservado que cortan el DNA al romper los enlaces fosfodiéster. Específicamente cortan el DNA de doble cadena en sitios específicos y desempeñan roles esenciales en el metabolismo, reparación y recombinación del DNA. En los fagos, las endonucleasas HNH forman parte de la maquinaria de empaquetado del DNA viral (35). Estudios recientes han demostrado que las proteínas derivadas de fagos pertenecientes al grupo de las endonucleasas HNH son tóxicas contra diversas bacterias. Por ejemplo, la proteína Ref del fago P1, que infecta *E. coli*, promueve el ciclo lítico durante la activación de la respuesta SOS de la bacteria en caso de daño en el DNA. Además, esta proteína interfiere con la síntesis del DNA al promover la degradación del genoma. Asimismo, se ha demostrado que Ref incrementa la susceptibilidad de *E. coli* al antibiótico ciprofloxacino, sugiriendo así que esta proteína podría utilizarse en sinergia con dicho antibiótico (36). Otra proteína perteneciente a este grupo es SegB, codificada por el fago T4. SegB contiene al menos cinco sitios de escisión ubicados dentro de los genes para tRNA-Gln, tRNA-Leu, tRNA-Gly, tRNA-Pro y tRNA-Ser (37).

Curiosamente, en este estudio también se identificó un péptido derivado de un factor sigma putativo. Los factores sigma son subunidades bacterianas que desempeñan un papel clave en la iniciación de la transcripción al guiar a la RNA polimerasa hacia el sitio promotor del gen o de los operones. Permiten la regulación precisa de la expresión génica en respuesta a diversos señales ambientales y condiciones celulares (38). Investigaciones recientes sugieren que los factores sigma derivados de fagos podrían interferir en la transición de las bacterias hacia un estado de dormancia, aumentando así sus posibilidades de supervivencia y replicación (39). Aunque *E. faecium* no forma endosporas, durante la formación de biofilms, existe un subgrupo de células conocidas como células persistentes que entran en estado de dormancia y muestran resistencia a los antibióticos. Se puede especular que los factores sigma u otras proteínas del fago podrían modular la fisiología de estas células en estado de dormancia. Esta posibilidad podría explicar por qué algunos fagos son eficaces contra las células persistentes en los biofilms, a diferencia de los antibióticos (40).

Dos PAMs identificados en este estudio son derivados de la enzima NAMLAA. La NAMLAA es una enzima bacteriana que forma parte

del grupo de las lisinas. Las lisinas de fagos, también conocidas como enzimas líticas de fagos, son proteínas producidas por estos, que se encargan de romper la pared celular bacteriana y liberar nuevas partículas del virus (41). Estas enzimas han sido objeto de investigación como agentes antimicrobianos potenciales debido a su capacidad para degradar selectivamente la pared celular bacteriana, lo que las hace efectivas contra una amplia gama de bacterias, incluidas las resistentes a los antibióticos. La NAMLAA es capaz de hidrolizar el enlace amida entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y el aminoácido L-alanina en la cadena peptídica de la pared celular, lo que conduce a la ruptura de esta estructura, la cual es esencial para la integridad bacteriana (42). Como consecuencia, esto conduce a la liberación de las partículas de los fagos en las últimas etapas de su ciclo de vida (43). Adicionalmente, al elevar artificialmente los niveles de expresión de las NAMLAAs, las bacterias se vuelven más susceptibles a ciertos antibióticos, lo que indica que péptidos con actividad NAMLAA podrían ser considerados como agentes antibacterianos (43). Con relación a otras enzimas del grupo de las lisinas, ciertos estudios han demostrado que estas pueden ser eficaces para el tratamiento de infecciones bacterianas tanto en cultivos bacterianos *in vitro* como en modelos animales *in vivo* (44, 45). Adicionalmente, se ha explorado su potencial aplicación en productos de higiene personal y desinfectantes para el control de la contaminación bacteriana en entornos clínicos y de procesamiento de alimentos (46).

Finalmente, se descubrió un péptido antimicrobiano derivado de una proteína con una metaloproteasa dependiente de ATP. Estudios previos han sugerido que ciertas proteínas de este tipo podrían tener actividad contra los biofilms. Por ejemplo, se ha observado que la proteína ClpP inhibe la formación de biofilms en *Staphylococcus aureus* al regular el regulador génico accesorio (Agr) y la hidrolasa de pared celular Sle1. Agr se encarga de estimular la producción de proteasas extracelulares, lo que contribuye a la dispersión del biofilm, mientras que Sle1 facilita la formación de DNA extracelular (eDNA), el cual es un componente esencial de los biofilms (47). En otras bacterias, se han identificado metaloproteasas dependientes de ATP, como la FtsH, que tienen la capacidad de degradar proteínas integrales de la membrana y del citoplasma (48).

Los resultados expuestos en el presente estudio demuestran la importancia de los PAMs y cómo estos podrían ser usados para combatir infecciones

causadas por bacterias resistentes a antibióticos. Adicionalmente, este estudio evidencia la gran versatilidad que poseen los PAMs, ya que pueden interferir con diversas vías metabólicas en bacterias o aniquilar directamente a la bacteria a través de la destrucción de su pared celular (49). Además, el presente estudio demuestra la potencial eficacia de los PAMs contra los biofilms, los cuales son resistentes a una serie de antibióticos (50). Algunos estudios previos ya han demostrado la eficacia de los PAMs tanto *in vitro* como *in vivo* (51); sin embargo, aún se requieren ensayos clínicos para demostrar la eficacia de su uso en seres humanos. Los PAMs, como las lisinas neumocócicas Cpl-1 y Pal, han sido utilizados con éxito en ensayos clínicos para tratar infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae*. Otros PAMs, como Ply3626 y PlyPH, han demostrado eficacia en el tratamiento de infecciones causadas por *Clostridium perfringens* y *Bacillus anthracis*, responsables principalmente de la gangrena gaseosa y el ántrax, respectivamente (20).

A pesar de las prometedoras aplicaciones de los PAMs identificados en este estudio, es importante destacar que el análisis *in silico* puede presentar sesgos, ya que las bases de datos utilizadas como punto de partida pueden contener errores o estar incompletas (52). Esto contrasta con los estudios experimentales, donde los investigadores pueden verificar los resultados de forma empírica. Adicionalmente, los puntos de corte se eligen de forma arbitraria, lo cual puede conllevar a sesgos en el análisis (52). Además, este tipo de estudios siempre requiere de una confirmación experimental antes de sacar conclusiones sobre la eficacia de las proteínas identificadas (53).

5. Conclusión

El presente estudio identificó una lista de PAMs eficaces contra la bacteria resistente a antibióticos *E. faecium*, que adicionalmente carecen de toxicidad y son eficaces contra los biofilms. Este estudio constituye la primera fase para el descubrimiento y desarrollo de nuevos PAMs que vayan dirigidos específicamente hacia esta bacteria. Futuros estudios realizarán una evaluación *in vitro* y, posteriormente *in vivo*, para determinar la eficacia de estos potenciales PAMs.

6. Agradecimientos

Quisiera extender un especial agradecimiento a las autoridades de la Facultad de Salud

Pública y de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en general, por su incondicional apoyo.

7. Conflicto de intereses

El autor declara que no tienen conflicto de intereses en la realización del presente trabajo.

8. Limitación de responsabilidad

Se declara que el manuscrito es de entera responsabilidad del autor.

9. Referencias bibliográficas

- Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW, Rossen JWA, Bathorn E. Enterococcus faecium: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):130.
- Willems RJ, van Schaik W. Transition of Enterococcus faecium from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol*. 2009;4(9):1125-35.
- Sheikh AF, Hamidi H, Shahin M, Shahmohammadi S. The prevalence of phenotypic and genotypic glycopeptides resistance among clinical isolates of enterococci in Ahvaz, southwestern Iran. *Gene Rep*. 2019;16:100415.
- Venkateswaran P, Vasudevan S, David H, Shaktivel A, Shanmugam K, Neelakantan P, Solomon AP. Revisiting ESKAPE Pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1159798.
- O'Toole RF, Leong KWC, Cumming V, Van Hal SJ. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium and the emergence of new sequence types associated with hospital infection. *Res Microbiol*. 2023;174(4):104046.
- Li W, Yang Z, Hu J, Wang B, Rong H, Li Z, Sun Y, Wang Y, Zhang X, Wang M, Xu H. Evaluation of culturable 'last-resort' antibiotic resistant pathogens in hospital wastewater and implications on the risks of nosocomial

1. Z
Rossen J

- antimicrobial resistance prevalence. *J Hazard Mater.* 2022;438:129477.
7. Piezzi V, Gasser M, Atkinson A, Kronenberg A, Vuichard-Gysin D, Harbarth S, Marschall J, Buetti N. Increasing proportion of vancomycin-resistance among enterococcal bacteraemias in Switzerland: a 6-year nationwide surveillance, 2013 to 2018. *Euro Surveill.* 2020;25(35):1900575.
 8. Yang J-x, Liu C-w, Wu F-w, Zhu L, Liang G-w. Molecular characterization and biofilm formation ability of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* bloodstream isolates from a Chinese tertiary hospital in Beijing. *Int Microbiol.* 2023;27:929-39.
 9. O'Neill J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resist.* 2014;20:1-16.
 10. Brives C, Pourraz J. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave Commun.* 2020;6(1):100.
 11. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 2011;1(2):111-4.
 12. Ogungbe BA, Awoniyi SO, Bolarinde BF, Awotimiro OE. Progress of phage therapy research as an alternative to antibiotics: Current status, challenges, and the future of phage therapeutics. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health.* 2024;2:100042.
 13. Du Toit A. Viral infection: The language of phages. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017;15(3):134-135.
 14. Zhang M, Zhang T, Yu M, Chen YL, Jin M. The Life Cycle Transitions of Temperate Phages: Regulating Factors and Potential Ecological Implications. *Viruses.* 2022;14(9).
 15. Blanco-Picazo P, Morales-Cortes S, Ramos-Barbero MD, García-Aljaro C, Rodríguez-Rubio L, Muniesa M. Dominance of phage particles carrying antibiotic resistance genes in the viromes of retail food sources. *ISME J.* 2023;17(2):195-203.
 16. Zhou S, Liu Z, Song J, Chen Y. Disarm The Bacteria: What Temperate Phages Can Do. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2023;45(2):1149-67.
 17. Casjens SR, Hendrix RW. Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant. *Virology.* 2015;479-480:310-30.
 18. Yang H, Ma Y, Wang Y, Yang H, Shen W, Chen X. Transcription regulation mechanisms of bacteriophages: recent advances and future prospects. *Bioeng.* 2014;5(5):300-4.
 19. Gruffat H, Marchione R, Manet E. Herpesvirus Late Gene Expression: A Viral-Specific Pre-initiation Complex Is Key. *Front Microbiol.* 2016;7 :869.
 20. Nandi A, Yadav R, Singh A. Phage derived lytic peptides, a secret weapon against *Acinetobacter baumannii* — An in silico approach. *Front. Med.* 2022;9: 1047752.
 21. Magana M, Pushpanathan M, Santos AL, Leanse L, Fernandez M, Ioannidis A, Giulianotti MA, Apidianakis Y, Bradfute S, Ferguson AL, Cherkasov A, Saleem MN, Pinilla C, Fuente-Nunez C, Lazaridis T, Dai T, Houghten RA, Hancock REW, Tegos GP. The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(9):e216-e30.
 22. Mikut R, Ruden S, Reischl M, Breitling F, Volkmer R, Hilpert K. Improving short antimicrobial peptides despite elusive rules for activity. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1858(5):1024-33.
 23. Wishart DS, Han S, Saha S, Oler E, Peters H, Grant JR, Stothard P, Gautam V. PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(W1):W443-w50.
 24. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, Wishart DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W16-21.
 25. Veltri D, Kamath U, Shehu A. Deep learning improves antimicrobial peptide recognition. *Bioinformatics.* 2018;34(16):2740-7.
 26. Gautam A, Chaudhary K, Kumar R, Sharma A, Kapoor P, Tyagi A, Open Source Drug Discovery (OSDD), Raghava GPS. In silico approaches for designing highly effective cell penetrating peptides. *J. Transl. Med.* 2013;11(1):74.
 27. Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022;20(10):621-35.

28. Sharma A, Gupta P, Kumar R, Bhardwaj A. dPABBs: A Novel in silico Approach for Predicting and Designing Anti-biofilm Peptides. *Sci Rep.* 2016;6:21839.
29. Gupta S, Kapoor P, Chaudhary K, Gautam A, Kumar R, Raghava GPS. Peptide Toxicity Prediction. *Methods Mol Biol.* 2015;1268:143-57.
30. Qu Q, Chen T, He P, Geng H, Zeng P, Luan G. Isolation and characterization of a novel lytic bacteriophage vB_Efm_LG62 infecting *Enterococcus faecium*. *Virus Genes.* 2023;59(5):763-74.
31. El-Telbany M, Lin CY, Abdelaziz MN, Maung AT, El-Shibiny A, Mohammadi TN, Zayda M, Wang C, Lwin SZC, Zhao J, Masuda Y, Honjoh K-I, Miyamoto T, El H. Potential application of phage vB_EfKS5 to control *Enterococcus faecalis* and its biofilm in food. *AMB Express.* 2023;13(1):130.
32. Xuan J, Feng W, Wang J, Wang R, Zhang B, Bo L, Chen Z-S, Yang H, Sun L. Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. *Drug Resist. Updat.* 2023;68:100954.
33. Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, Alqumber MAA. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Basel).* 2023;11(13):1946.
34. Jadimurthy R, Mayegowda SB, Nayak SC, Mohan CD, Rangappa KS. Escaping mechanisms of ESKAPE pathogens from antibiotics and their targeting by natural compounds. *Biotechnol Rep (Amst).* 2022;34:e00728.
35. Zhang L, Xu D, Huang Y, Zhu X, Rui M, Wan T, Zheng X, Shen Y, Chen X, Ma K, Gong Y. Structural and functional characterization of deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2 HNH endonuclease. *Sci Rep.* 2017;7(1):42542.
36. Ronayne EA, Wan YC, Boudreau BA, Landick R, Cox MM. P1 Ref Endonuclease: A Molecular Mechanism for Phage-Enhanced Antibiotic Lethality. *PLoS Genet.* 2016;12(1):e1005797.
37. Brok-Volchanskaya VS, Kadyrov FA, Sivogrivov DE, Kolosov PM, Sokolov AS, Shlyapnikov MG, Kryukov VM, Granovsky IE. Phage T4 SegB protein is a homing endonuclease required for the preferred inheritance of T4 tRNA gene region occurring in co-infection with a related phage. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(6):2094-105.
38. Feklístov A, Sharon BD, Darst SA, Gross CA. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:357-76.
39. Berkvens A, Chauhan P, Bruggeman FJ. Integrative biology of persister cell formation: molecular circuitry, phenotypic diversification and fitness effects. *J R Soc Interface.* 2022;19(194):20220129.
40. Maffei E, Woischnig A-K, Burkolter MR, Heyer Y, Humolli D, Thürk Kauf N, Bock T, Schmidt A, Manfredi P, Egli A, Khanna N, Jenal U, Harms A. Phage Paride can kill dormant, antibiotic-tolerant cells of *Pseudomonas aeruginosa* by direct lytic replication. *Nat Commun.* 2024;15(1):175.
41. Tsourkas PK. Paenibacillus larvae bacteriophages: obscure past, promising future. *Microb Genom.* 2020;6(2):e000329.
42. Lopez-Arvizu A, Rocha-Mendoza D, Ponce-Alquicira E, García-Cano I. Characterization of antibacterial activity of a N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase produced by *Latilactobacillus sakei* isolated from salami. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37(4):65.
43. Romero P, López R, García E. Characterization of LytA-like N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases from two new *Streptococcus mitis* bacteriophages provides insights into the properties of the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol.* 2004;186(24):8229-39.
44. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012;7(10):1147-71.
45. Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(6):357-62.
46. Kocot AM, Briers Y, Plotka M. Phages and engineered lysins as an effective tool to combat Gram-negative foodborne pathogens. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2023;22(3):2235-66.

47. Liu Q, Wang X, Qin J, Cheng S, Yeo WS, He L, Ma X, Liu X, Li M, Bae T. The ATP-Dependent Protease ClpP Inhibits Biofilm Formation by Regulating Agr and Cell Wall Hydrolase Sle1 in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:181.
48. Akiyama Y. Proton-motive force stimulates the proteolytic activity of FtsH, a membrane-bound ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002;99(12):8066-71.
49. Huan Y, Kong Q, Mou H, Yi H. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol.* 2020;11:582779.
50. Abebe GM. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *Int J Microbiol.* 2020;2020:1705814.
51. Wu X, Wang Z, Li X, Fan Y, He G, Wan Y, Yu C, Tang J, Li M, Zhang X, Zhang H, Xiang R, Pan Y, Liu Y, Liu L Yang L. In vitro and in vivo activities of antimicrobial peptides developed using an amino acid-based activity prediction method. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(9):5342-9.
52. Sacan A, Ekins S, Kortagere S. Applications and limitations of in silico models in drug discovery. *Methods Mol Biol.* 2012;910:87-124.
53. Le V, Crouser ED. Chapter 5 - Sarcoidosis Models: Past, Present, and Future. In: Baughman RP, Valeyre D, editors. *Sarcoidosis*. Philadelphia: Elsevier; 2019. p. 67-73.